

• 药剂 •

斑秃生发颗粒质量标准的研究

郭宇洁¹, 冯青然², 张保献²

(1. 中国中医研究院西苑医院, 北京 100091; 2. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 目的: 建立斑秃生发颗粒的质量标准。方法: 用 HPLC 法对斑秃生发颗粒中主要成分 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷进行含量测定, 流动相为乙腈-3% 冰乙酸水(12: 88), 检测波长 320nm。同时对制剂中的主要药味黄芪、何首乌、当归、羌活进行薄层鉴别。结果: 平均加样回收率为 99.33%, RSD = 1.74% (n = 6)。薄层图谱斑点清晰, 阴性对照无干扰。结论: 本方法可靠准确、重现性好, 可有效控制制剂的质量。

关键词: 斑秃生发颗粒; 质量标准; 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷; 制何首乌

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)01-0001-03

The Quality Standard of Bantushengfa Granules

GUO Yu-jie¹, FENG Qing-ran², ZHANG Bao-xian²

(1. Xiyuan hospital China academy of traditional Chinese Medicine, Beijing 100091, China;

2. Institute of Chinese Material Medica, China academy of traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract: Objective: To establish the quality of Bantushengfa granules. Methods: The content of main component, 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, was determined by HPLC. The mobile phase consisted of acetonitrile-3% acetic acid water solution(12: 88) and UV detection wavelength was 320nm. Result: The average recovery and RSD were 99.33% and 1.74%, respectively. Conclusion: The method is accurate, reproducible and can be used for content of Bantushengfa granules.

Key words: Bantushengfa granules; Quality standard; 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside; Radix Polygoni Multiflori Preparata

斑秃生发颗粒是经过临床实践探索总结出的临床验方, 由制何首乌、黄芪、当归、羌活等十余味药材组成。斑秃生发颗粒对于肝肾不足型的斑秃、全秃、病后及产后脱发具有较好的疗效。制何首乌系方中君药, 具有补肝肾, 益精血, 壮筋骨, 乌须发等功效。其主要有效成分为蒽醌类化合物及二苯乙烯苷类成分, 以前曾以 emodin 为确认试验的指标成分。而今, 由于 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷是何首乌药材独特且具有生物活性的成分^[1], 所以测定此成分的含量对该制剂的质量控制具有实际应用。本文建立了以 HPLC 法测定斑秃生发颗粒中制何首乌的二苯乙烯苷含量测定方法。同时对制剂中的制何首乌、黄芪、当归、羌活进行薄层鉴别, 取得满意结果。

1 仪器与试药

HP1100 高效液相色谱仪; 色谱柱: ZORBAX R_x-

C₁₈; 乙腈为色谱纯, 其余所用试剂均为分析纯; 重蒸馏水; 对照品为 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷(以下简称二苯乙烯苷), 由中国药品生物制品检定所提供, 经 HPLC 测定(0844-9801) 纯度为 99.84%。黄芪、何首乌、当归、羌活为对照药材; 硅胶 G(青岛海洋化工厂); 斑秃生发颗粒由中药所制剂室提供。

2 薄层色谱鉴别

2.1 黄芪薄层色谱鉴别 取本品 10g, 加 2% KOH 甲醇溶液 50ml, 回流 1h, 滤过, 蒸干, 加水 30ml 使溶解, 置分液漏斗中, 以氯仿-正丁醇(2: 1) 萃取 3 次, 每次 15ml, 合并萃取液, 以 1% KH₂PO₄ 水溶液 50ml 洗涤, 弃去水液, 萃取液蒸干, 残渣加甲醇 2ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取黄芪甲甙对照品, 加甲醇制成每 1ml 含 0.3mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(附录 VIB) 试验。吸取上述两种溶液各 6μl, 分别点于同一以 0.3% 羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水(65: 35: 10) 为

展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105℃烘烤 20min 至斑点显色清晰。供试品中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。

2.2 何首乌薄层鉴别 取本品 10g, 加甲醇 50ml, 浸泡 12h, 超声 15min, 滤过, 蒸干, 残渣加 5% NaOH 溶液 5ml, 置分液漏斗中, 加盐酸化, 用乙酸乙酯 10ml 萃取, 分取乙酸乙酯液, 作为供试品溶液。另大黄素对照品, 加甲醇制成每 ml 含 0.3mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(附录 VIB) 试验。吸取上述两种溶液各 6μl, 分别点于同一以 0.3 羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(15:2:1)的上层溶液为展开剂, (预平衡 15min), 展开, 取出, 晾干, 目光下观察。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。

2.3 当归薄层鉴别 取本品 20g, 研细, 加乙醚 50ml, 回流 1h, 放冷, 滤过, 挥干乙醚, 残渣加丙酮 1ml 使溶解, 作为对照品溶液。另取当归对照药材 0.3g, 同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(附录 VIB) 试验。吸取供试品溶液 20μl, 对照药材溶液 6μl, 分别点于同一以 0.15% 羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-乙酸乙酯(9:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯下(365nm)下检视, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。

2.4 羌活薄层鉴别 取本品 20g, 研细, 置 100ml 圆底烧瓶中, 加水 60ml, 接挥发油提取器, 并在接油处加水及 1ml 正丁烷, 收集正丁烷为供试品溶液。另取羌活对照药材 6g, 同法处理得对照药材溶液。照薄层色谱法(附录 VIB) 试验, 吸取供试品溶液 25μl, 对照药材溶液 10μl, 分别点于同一以 0.15% 羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯(85:15)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛 H₃PO₄ 溶液, 105℃加热 5min 使斑点显色清晰, 立即观察, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。

3 含量测定

3.1 色谱条件与系统适应性试验 色谱柱: ZORB-AX R_x-C₁₈; 流动相: 乙腈: 30% 冰乙酸水(12:88); 柱温: 35℃; 流速: 1ml/min; 检测波长: 320nm。柱温: 35℃; 理论塔板数按二苯乙烯苷峰计算应不低于 2000, 在此条件下二苯乙烯苷与其它成分达到基线分离。

3.2 线性关系考察 精密称取二苯乙烯苷对照品 5.50mg, 置 10ml 容量瓶中, 加流动相(乙腈-3% 冰乙酸水=12:88) 溶解并定容摇匀, 即得 550μg/ml 的二苯乙烯苷的对照品溶液。取上述二苯乙烯苷对照溶液 0.2ml、0.4ml、0.6ml、1.2ml、2.0ml, 置 10ml 容量瓶中, 依次以流动相来定容, 分别得到 11、22、33、66、110μg/ml 的二苯乙烯苷对照品溶液, 各吸取 10μl, 注入高效液相仪, 测定峰面积, 以二苯乙烯苷进样量(μg) 为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y) 作图, 得到标准曲线, 计算回归方程为: $Y = 3296.3158X + 2.2368$, $r = 0.9999$ ($n = 5$)。说明二苯乙烯苷在 0.11~1.1mg 范围内, 峰面积和进样量良好的线性关系。因为标准曲线基本通过原点, 采用一点法计算。

3.3 检测波长的选择 精密称取 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯苷对照品, 用甲醇溶解, 制成每 1ml 含 0.015mg 的二苯乙烯苷的溶液, 用紫外-可见分光光度计扫描测定, 扫描范围为 200~800nm, 可以看到二苯乙烯苷在 320nm 处有最大吸收, 故选择 320nm 为检测波长。

3.4 精密度试验 精密称取样品 0.5698g, 余同样品测定项下操作得到样品供试液, 连续进样 5 次, 进样量为 10μl, 测定峰面积, 相对标准偏差 RSD 为 1.0097%。

3.5 稳定性试验考察 将配制好的样品供试液在制备后第 0、2、4、6、8、24h 测定, 结果表明, 二苯乙烯苷在 24h 内基本稳定, 相对标准偏差 RSD 为 1.81%。

3.6 重复性试验 取同批样品 5 袋, 混合研细, 精密称取 5 份样品, 按样品测定项下制备供试液, 进行测定, RSD 为 1.346%, 说明含量测定方法稳定, 重现性较好。

3.7 回收率试验 采用加样回收法, 称取已知含量的同一批样品(批号 20000717) 6 份, 精密称定, 前三份样品中精确加入二苯乙烯苷对照品 0.2750mg, 后三份样品中加入 0.5225mg, 按样品测定项下方法进行制备和测定, 平均回收率为 99.33%, RSD 为 1.74%, 说明含量测定方法可行, 结果见表 1。

3.8 阴性对照品溶液的制备 按照处方比例称取除去何首乌的其他药材适量, 依照斑秃生发颗粒的制备方法制备阴性对照品溶液。

3.9 样品测定 取斑秃生发颗粒 0.5g, 精密称定, 精密加入 60ml 水, 充分溶解, 离心 15min, 精密吸取上清液 15ml, 置分液漏斗中, 以乙酸乙酯萃取 4 次(20, 15, 15, 15ml), 合并乙酸乙酯液, 以无水硫酸钠脱

水,滤过,再以乙酸乙酯洗涤硫酸钠残渣2次(10, 5ml),将洗涤液并入乙酸乙酯液,回收至干,以流动相定容于10ml量瓶中。取上清液2ml,微孔滤膜(0.2 μ m)滤过,得到斑秃生发颗粒的供试品溶液,按照已确定的高效液相方法,吸取33 μ g/ml二苯乙烯苷对照品溶液10 μ l,斑秃生发颗粒供试品溶液20 μ l,分别进样,测定斑秃生发颗粒中二苯乙烯苷的含量,测定结果显示,三批制剂中二苯乙烯苷的含量均不低于0.9mg/g,结果见表2。

表1 二苯乙烯苷回收率测定结果($n=6$)

样品称样量 (g)	样品中含量 (g)	添加量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.4621	0.4532	0.2750	99.85		
0.4773	0.4681	0.2750	97.82		
0.4877	0.4783	0.2750	97.45		
0.4946	0.4851	0.5225	98.27	99.33	1.74
0.4932	0.4837	0.5225	101.45		
0.5127	0.5028	0.5225	101.13		

表2 斑秃生发颗粒中二苯乙烯苷含量($n=3$)

批号	二苯乙烯苷含量(mg/g)		
	1	2	3
000529	1.33	1.32	1.34
000609	1.12	1.17	1.16
000717	0.97	0.96	0.99

4 讨论

4.1 黄芪甲苷薄层鉴别 方中黄芪所含黄芪甲苷薄层鉴别时,曾采用药典所载黄芪的薄层鉴别方法进行薄层层析,但薄层板上样品色谱成带状,掩盖了黄芪甲苷的斑点,且黄芪甲苷对照品的Rf值较小。

后来又以正文中的碱提法处理样品,得到的黄芪甲苷斑点清晰,为橙黄色斑点,同法制备的阴性对照无干扰。经样品、药材、阴性对照试验,确认该方法可行,故列入正文。

4.2 何首乌所含大黄素薄层鉴别 方中何首乌所含大黄素薄层鉴别时,曾采用0.5%NaOH铺成的硅胶G板进行薄层鉴别,发现大黄素斑点拖尾很厉害,考虑到大黄素结构中有羟基,碱板很有可能是造成拖尾的原因,于是改用0.3%羟甲基纤维素钠为粘和剂铺板,大黄素斑点清晰集中,阴性对照品亦无干扰。

4.3 样品提取溶剂的选择 二苯乙烯苷不溶于氯仿,可溶于95%乙醇、乙酸、乙酯等有机溶剂^[2],95%乙醇可以和水互溶,不能用于和水的两相萃取,乙酸乙酯极性适中,对二苯乙烯苷有良好的溶解性,可以用于和水的两相萃取,故选择乙酸乙酯为溶剂。

4.4 样品提取方法的考察 曾比较了乙酸乙酯热回流1h、乙酸乙酯超声提取30min及乙酸乙酯萃取法(取正文法)的提取效果,结果表明,前两种方法的提取效果差,原因可能是乙酸乙酯的穿透能力差,不能将二苯乙烯苷从样品中提取出来。正文所载方法为先水溶,再以乙酸乙酯萃取,就可以解决这一问题,提取效果很好,所以选择乙酸乙酯萃取的方法。

4.5 乙酸乙酯萃取次数的选择 将样品萃取5次,每次萃取液按照正文方法进行含量测定,第4份、第5份萃取液中没有峰面积,3次萃取已基本完全,为了保证萃取完全,将萃取次数定为4次。

参考文献:

- [1] 陈建志.何首乌的质量研究 VI 何首乌中二苯乙烯苷的含量测定方法[J]. Chin Med, 8(2): 110-110, 1997.
- [2] 姚树根,孙小萍,周国豪,等.何首乌的质量研究 VI 何首乌中二苯乙烯苷的含量测定方法[J]. 药物分析杂志, 1984, 4(1): 28.